

BL

VERIFICATION OF TRANSLATION

RE: PUBLICATION OF UNEXAMINED JAPANESE PATENT APPLICATION
NO. Sho-63-179829

I, Kazunori Shibata, Toranomom East Bldg., 7-13, Nishi-Shimbashi
1-chome, Minato-ku, Tokyo, Japan, am the translator of Publication
of Unexamined Japanese Patent Application No. Sho-63-179829 and I
state that the following is a true translation to the best of my
knowledge and belief.

(Signature of Translator) Kazunori Shibata
(Date) This 11th day of October, 2007.

Specifidation

1. Title of the Invention

Antibacterial Agents for Skin

2. Claims

(1) An antibacterial agent for skin comprising as an active ingredient the cell and/or water extract of microorganism belonging to Streptococcus, Lactobacillus or Bifidobacterium.

(2) An antibacterial agent for skin as claimed in Claim (1), wherein said microorganism is Streptococcus faecium, S. durans, S. avium, S. faecalis, Lactobacillus brevis, L. salivarius, Bifidobacterium adolescentis, B. breve, or B. longum.

3. Detailed Description of the Invention

The present invention relates to antibacterial agents for skin, particularly, anti-acne agents, improvers for skin diseases or skin-protective agents, comprising as an active ingredient the cell and/or water extract of a microorganism belonging to Streptococcus, a microorganism belonging to Lactobacillus /or a microorganism belonging to Bifidobacterium.

As an antibacterial material effective against major

causative bacteria of acne (pimple), *Propionibacterium acnes* or *Corynebacterium parvum*, hexachlorophene and the like are known, of which the side effect such as an influence on the human body and intestinal bacteria, however, has not yet been elucidated, and thus these do not always seem to be safe in absorption from the skin applied or invasion into the body by oral administration.

In the above-mentioned situation, the present inventors worked assiduously and found that the cells or water extracts of lactic acid bacteria derived from the intestinal bacteria of healthy persons, that is, microorganism belonging to *Streptococcus*, *Lactobacillus* or *Bifidobacterium*, have a potent antibacterial action against *Propionibacterium acnes*, and the cells of these lactic acid bacteria or water extract thereof are totally innoxious in the tests of oral administration or application to the skin, including the influence on intestinal bacteria or skin. Thus, the invention was completed.

The species and bacteriological properties, screening method, method for preparing the cells, and pharmacological actions, of the microorganisms used in the invention will be explained in detail as follows.

Microorganisms

Exemplary and preferred microorganism includes those

belonging to Streptococcus, Lactobacillus or Bifidobacterium, particularly, Streptococcus faecium, S. durans, S. avium, S. faecalis, Lactobacillus brevis, L. salivarius, Bifidobacterium adolescentis, B. breve, and B. longum. Table 1 summarizes the strains particularly useful in the invention together with the FERM P Accession Number.

Table 1

Name of Strain		Accession No.
Streptococcus faecium	AD1005	FERM P-8697
Streptococcus avium	AD2001	FERM P-8698
Streptococcus durans	AD3003	FERM P-8699
Streptococcus faecalis	AD9002	FERM P-8696
Lactobacillus brevis	AD0012	FERM P-8695
Lactobacillus salivarius	AD0013	FERM P-8694
Bifidobacterium adolescentis	AD0053	FERM P-8693
Bifidobacterium breve	AD0054	FERM P-8692
Bifidobacterium longum	AD0057	FERM P-8691

Bacteriological Properties

The screening method and bacteriological properties such as identification of the microorganisms of the invention are summarized as follows.

1. Screening Method

Screening was carried out in accordance with the method described in Watanabe, T., et al., Studies on streptococci, I. Distribution of fecal streptococci in man, Microbiol. Immunol. 25, 257-269 (1981). According to the description of the above-cited reference, the feces of a healthy person were

diluted with a diluent solution of the following component (Table 2); Streptococcus was smeared on a KMN agar [vander Weil-Korstanje, J.A.A., and K. Q. Winkder: J. Med. Microbiol. 8 491 (1975); Table 3]; Lactobacillus was on an LBS agar [BBL, Table 4]; and Bifidobacterium was on an MPN agar [Tanaka, R. et al., Appl. Environ. Microbiol. 40, 866-869 (1980); Table 5], respectively; they were cultured at 37°C in an aerobic or anaerobic condition for a period of 48 to 72 hours; the generated colonies were counted and collected at random, and the shape of the colony and their catalase activity (negative) were confirmed; the gram-stain positive cocci and bacilli were isolated, respectively, and their physiological and biochemical properties were examined for classification and identification.

Table 2

Components of the diluent solution

KH ₂ PO ₄	4.5 g
Na ₂ HPO ₄	6.0 g
L-Cysteine hydrochloride	0.5 g
Tween 80	0.5 g
Agar	1.0 g
Purified water	1000 ml

Table 3

Components of KMN agar (Red-Kanamycin-milk agar)

	Tryptose	15 g	
	Meat extract	3 g	
A	Sodium azide	0.2 g	pH 6.8
	Common salt	5 g	121°C, 10 min
	Agar	18 g	
	Purified water	800 ml	
	Skim milk	16 g	
B	Neutral red	40 mg	100°C, 1 hr
	Purified water	200 ml	
C	Kanamycin	24 mg	

A, B and C were respectively sterilized, combined and made into a plate.

Table 4

Components of LBS agar (BBL)

	Tryptose	10 g	
	Meat extract	5 g	
	KH ₂ PO ₄	6 g	
	Triammonium citrate	2 g	
	Glucose	20 g	
	Anhydrous sodium acetate	15 g	
	Tween 80	1 g	
	MgSO ₄ 7H ₂ O	575 mg	
	MnSO ₄ 2H ₂ O	120 mg	
	FeSO ₄ 7H ₂ O	34 mg	
	Agar	15 g	
	Purified water	100 ml	pH 5.5

Sterilized under heating at 121°C for 15 minutes

Table 5

Components of MPN agar

Lactose	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	20 mg
FeSO ₄ 7H ₂ O	1 mg
MnSO ₄ 2H ₂ O	0.8 mg
Common salt	1 mg
0.1% Risazurin	0.1 mg
Biotin	0.01 mg
Calcium pantothenate	0.2 mg
Riboflavin	0.1 mg
Adenine	0.1 mg
Guanine	0.1 mg
Xanthine	0.1 mg
Uracil	0.1 mg
Tween 80	0.1 g
10% Pyruvic acid	0.1 ml
8% Na ₂ CO ₃	5 ml
3% L-Cysteine hydrochloride	1 ml
Nalidixic acid	10 mg
1.6% Bromocresol purple	0.1 ml
Agar	2 g
Purified water	100 ml pH 6.8

Sterilized under heating at 100°C with no pressure for 30 minutes

2. Identification of Isolated Lactic Acid Bacteria

The typical bacteriological properties of the microorganisms of the invention are the same as described in the publicly known documents because they belong to the same classification.

That is, they were identified in reference to the

following documents 1) to 4) on the shape of colony, gram staining, morphology, and physiological and biochemical property when cultured on the KMN agar medium as a selective medium for Streptococcus bacteria, the LBS agar medium as a selective medium for Lactobacillus bacteria, and the MPN agar medium as a selective medium for Bifidobacterium bacteria.

Reference

- 1) Tomotari Mitsuoka, Nippon Saikingaku Zasshi (Journal of Bacteriology, Japan), 24(6), 261-280 (1969)
- 2) Poupard, J.A., Husain, I. and Norris, R.F., Bacteriol. Rev., 37 136-165 (1973)
- 3) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. 490-676 (1974)
- 4) Tomotari Mitsuoka, Rinsyo to Saikin (Clinical and Bacteria), 2(3), 55(197)-97(239), (1975)

The major bacteriological properties on which the identification has been made are as shown in Tables 6 to 8.

Table 6

	S. faecium AD1005	S. avium AD2001	S. durans AD3003	S. Faecalis AD9002
Gram stain (positive +)	+	+	+	+
Catalase (with boiled blood)	-	-	-	+
Growth at 10°C	+	+	+	+
Growth at 45°C	+	+	+	+
Growth at pH 9.6	+	+	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	+
Growth in 40% bile	+	+	+	+
Growth in 1/4000 tellurite	-	-	-	+
Growth in 0.1% methylene blue milk	+	UD	+	+
Carbohydrate fermentation				
Arabinose	+	+	-	-
Glycerin	-	+	-	+
Raffinose	-	+	-	-
Sorbitol	-	+	-	+
Xylose	+	+	-	+
Mannitol	+	+	UD	+
Esculin hydrolysat	+	+	+	+
Arginine hydrolysat	+	+	+	+
Remark) +: positive; -: negative; UD: undecided				

Table 7

	L. brevis AD0012	L. salivarius AD0013
Gram stain	+	+
Catalase	-	-
Gas generation	+	-
Growth at 15°C	+	-
Growth at 45°C	-	+
Carbohydrate fermentation		
Arabinose	+	-
Xylose	+	-
Ribose	+	-
Mannose	-	+
Cellobiose	-	-
Raffinose	-	+
Melezitose	-	-
Starch	-	+
Mannitol	-	+
Salicin	-	-
Amygdalin	-	-
Rhamnose	-	+
Remark) +: positive; -: negative		

Table 8

	B. adolescentis AD0053	B. breve AD0054	B. longum AD0057
Gram stain	+	+	+
Gas generation from glucose	-	-	-
Carbohydrate fermentation			
Arabinose	+	-	+
Xylose	+	-	+
Mannose	+	-	-
Cellobiose	+	+	±
Raffinose	+	+	+
Melezitose	+	-	±
Mannitol	+	+	-
Sorbitol	+	+	+
Salicin	+	+	-
Amygdalin	+	-	-
Inulin	+	-	±
Trehalose	+	-	-
Ribose	+	+	+

Remark) +: positive; ±: pseudo-positive; -: negative

3. Culture Method

These microorganisms are cultured in a conventional manner as shown in the above respective documents; for example, the microorganisms of Streptococcus and Lactobacillus may be cultured on a Rogosa liquid medium (Note 1), and the microorganism of Bifidobacterium on a GAM liquid medium (Note 2); Streptococcus and Lactobacillus may be cultured aerobically or anaerobically, and Bifidobacterium anaerobically. The resulting culture broth is subjected to centrifugation to recover the cells.

(Note 1) Components of the Rogosa liquid medium

In 1L of distilled water

Trypticase	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
Tryptose	3.0 g
K ₂ HPO ₄	3.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
Sodium acetate ^(*)	1.0 g
Triammonium citrate	2.0 g
Tween 80	1.0 g
Glucose	20.0 g
L-Cysteine hydrochloride	0.2 g
Salt solution ^(**)	5.0 ml
(pH 7.0, sterilized under heating at 121°C for 15 minutes)	

(*) Sodium acetate is not necessary for Streptococcus

(**) Salt solution contains the followings in 100 ml of distilled water.

MgSO ₄ 7H ₂ O	11.5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.68 g
MnSO ₄ 2H ₂ O	2.4 g

(Note 2) Components of the GAM liquid medium

GAM bouillon (Nissui Pharm. Co.) Code 05422	59.0 g (for 1L)
Peptone	10.0 g
Soybean peptone	3.0 g
Proteose peptone	10.0 g
Digested serum powder	13.0 g
Yeast extract	5.0 g
Meat extract	2.2 g
Liver extract powder	1.2 g
Glucose.	3.0 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
Sodium chloride	3.0 g
Soluble starch	5.0 g
L-Cysteine hydrochloride	0.3 g
Sodium thioglycolate	0.3 g

(pH 7.3±0.1, sterilized under heating at 115°C for 15 minutes)

The resulting cells may be used as pharmaceuticals as such in a form of live cells or thermally treated killed cells, or alternatively they may be utilized as destroyed cells treated by ultra-sonication, etc. Therefore, the "killed cells" of the invention also include the whole or part of these destroyed cells.

Preparation of antibacterial agents for skin

The antibacterial agent for skin of the invention comprises the sterilized cells or water extract of a variety of the above-described microorganisms as an active ingredient. Some of the typical methods for preparation of the agents are exemplified as follows.

1. Extraction with Hot Water

The collected cells are subjected to extraction with hot water at 80-130°C (more preferably, 100-120°C) under or without pressure for a period of several minutes to several hours, during which time sterilization is also achieved. Water-insoluble solid portion is removed by centrifugal separation to give a water-soluble fraction containing the objective active ingredient. The solvent used for extraction includes not only usual physiological saline (0.9% NaCl aqueous solution) but also a variety of buffers adjusted at a defined pH, a variety of salt solutions, a water/alcohol (methanol or ethanol) mixture of 1 : 2 or more (by weight) or around, a variety of aqueous solvents, as well as water alone.

In addition, the whole of the collected cells which have been subjected to extraction and sterilization with hot water as mentioned above, without any treatment for removal of the solid portion by centrifugation, may be directly lyophilized or dried under reduced pressure or by spraying to give dry powder, which can be used as an antibacterial agent for skin in the invention.

2. Treatment for Sterilization

A variety of sterilized cells obtained from the collected cells by thermal sterilization such as spray drying or by destruction by ultra-sonication (e.g., 15 kc, 60 minutes) may be employed as active ingredient for the antibacterial agent

for skin of the invention. Further, the sterilized cells may be subjected to extraction with water to yield a water-soluble material as the objective active fraction.

Antibacterial Activity

1. Antibacterial Activity

As shown in the experimental examples below, the antibacterial agent for skin of the invention suppresses or inhibits very effectively the growth of causative bacteria of acne belonging to *Propionibacterium*. On the other hand, the agent shows such a selective and specific antibacterial spectrum that it has practically no inhibitory effect against major lactic acid bacteria (*Streptococcus faecalis*, *S. faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. brevis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. breve*) in the intestinal bacteria.

2. Toxicity

In oral administration, the agent is practically quite innoxious. The LD₅₀ value was about 5 mg/mouse or more as hot water extract or sterilized cells.

3. Form of Use

The antibacterial agent for skin of the invention may be preferably used as a variety of cosmetics including bath preparations or bath cosmetics, facial wash, sunburn cream, hair or head skin tonics, lip sticks, rouge and the like as

well as a composition to be applied to skin or in the form of a dermatologic disorder improving or skin protective coating powder or cream while being added to a skin disinfectant. The amount to be used as the processed cells or their water extract is approximately 0.001-10 wt % (calculated in terms of the dry weight).

The following Experimental Examples will explain the invention in more detail.

Experimental Example 1

Growth inhibitory action of *Propionibacterium acnes*: 1640001 (provided by Research Institute for Microbial Diseases, Microbes Depository Unit, Osaka University)

The respective lactic acid bacteria of the invention were inoculated on the Rogosa liquid medium or GAM liquid medium so that the live cell concentration was approximately 10^6 /ml, and cultured under an aerobic or anaerobic condition at 37°C for a period of 15-24 hours. After completion of the culture, the cells were collected by centrifugation, then suspended in about 10 parts by volume of physiological saline and collected again; this operation was repeated twice to obtain washed cells. The cells were suspended in 1 part by volume of distilled water, and heated in an autoclave at 110-120°C for 10-15 minutes. Then, centrifugation was carried out, and the supernatant was used as a sample as such or as lyophilizate. The GAM agar medium (Note) containing the above sample was placed under an

anaerobic condition, on which *Propionibacterium acnes* (about 10^3) was inoculated and cultured under an anaerobic condition. After the lapse of 48 hours, the number of colonies produced was counted and compared with that from the control containing no sample, and the inhibition ratio was determined. Table 9 shows the results.

Table 9.

Species	Cell number/plate	Inhibition ratio
Control	441	-
<i>Streptococcus faecium</i> AD 10C5	1	99.8%
<i>Streptococcus faecium</i> AD 10C5	40	90.9%
<i>Streptococcus avium</i> AD 2001	178	59.6%
<i>Streptococcus durans</i> AD 3003	56	87.3%
<i>Streptococcus faecalis</i> AD 9002	293	33.6%
<i>Lactobacillus brevis</i> AD 0012	181	59.0%
<i>Lactobacillus salivarius</i> AD 0013	108	75.5%
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> AD 0053	72	83.7%
<i>Bifidobacterium breve</i> AD 0054	244	44.7%
<i>Bifidobacterium longum</i> AD 0057	114	74.1%

As clearly seen from the above results, 3 species of *S. faecium*, *S. durans* and *B. adolescentis* strongly inhibited the growth of *P. acnes*, and the other 6 species also inhibited the growth.

Among these 9 species, particularly, *S. faecium* AD1005 allowed formation of only one colony of *P. acnes* per plate, in contrast to the control (i.e., the group to which only water, which is the solvent of the cell extract, was added) in which 441 colonies per plate were formed, indicating that *S. faecium* has so strong bacteriostatic action that the growth of *P. acnes* is inhibited approximately 100%.

Experimental Example 2

Comparison of the inhibitory action of *Streptococcus* on the growth process of *P. acnes*

A GAM liquid medium containing a sample prepared in the same manner as in Experimental Example 1 was placed under an anaerobic condition, on which *P. acnes* was inoculated at 10^6 /ml and cultured under an anaerobic condition. After the lapse of 0, 6, 12, 24, and 30 hours, the number of live cells (/ml) was counted. Fig. 1 shows the results. *S. faecium*, *S. durans*, *S. avium*, and *S. faecalis* inhibited in this order the growth of *P. acnes*. *S. faecium* AD1005 inhibited the growth of *P. acnes* over nearly 30 hours. The number of cells after 12-15 hours was less than that at 0 hour, indicating that the sample shows

a bacteriostatic action.

Though not indicated herein, it should be added that *B. adolescentis* AD0053 also shows nearly the same result as *S. durans*.

Experimental Example 3

Inhibitory action of *S. faecium* AD1005 against the growth of *Propionibacterium acnes*

For *S. faecium* AD1005, the water extract solution of cells prepared in the same manner as in Experimental Example 1 was made 3 serial concentrations by weight of dry cells, which were added to the GAM liquid medium and treated in the same manner as in Experimental Example 2. Table 2 shows the results.

As shown in the figure, the growth of *P. acnes* was inhibited in proportion to the concentration (amount of protein). The inhibition ability sustained clearly up to around 12 hours after cultivation.

Antimicrobial Spectrum

The above-mentioned extract with hot water was added to intestinal bacteria (various lactic acid bacteria and *Escherichia coli*), and the effect was examined in a usual way. The following Table 10 summarizes the results. As seen from Table, it is recognized that the extract with hot water is inactive to the major intestinal bacteria.

Table 10

Test Strain	Extracted Strain					
	S. faecium AD1005	S. avium AD2001	S. durans AD3003	S. faecalis AD9002	B. adolescentis AD0053	L. salivarius AD0013
S. faecium	-	-	-	-	-	-
S. durans	-	-	-	-	-	-
S. avium	-	-	-	-	-	-
S. faecalis	-	-	-	-	-	-
S. mitis	-	-	-	-	-	-
L. acidophilus	-	-	-	-	-	-
L. fermentum	-	-	-	-	-	-
B. adolescentis	-	-	-	-	-	-
B. breve	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli	-	-	-	-	-	-

Remark) -: no inhibition; +: positive inhibition

Acute Toxicity

(1) ICR Mice (male, 6 weeks of age, average body weight 33.0 ± 0.5 g) were used. The extract with hot water prepared according to the above hot water extraction method was intraperitoneally administered in the 3 serial starting cell numbers of 9×10^9 , 9×10^8 and 9×10^7 cells per a mouse (10 mice in each group) as a suspension in physiological saline (0.5 ml), and the life and death of the mice were observed for 14 days.

Table 11 shows the LD₅₀ value (mg/mouse) calculated according to the Behrens-Kärber method. When administered orally every day or applied to the skin, no toxicity was observed in any cases.

Table 11

Name of Strain		LD ₅₀ (mg/mouse)
S.faecium	AD1005	7.4 mg
S.avium	AD2001	7.3 mg
S.durans	AD3003	6.8 mg
S.faecalis	AD9002	7.0 mg
L.brevis	AD0012	6.6 mg
L.salivarius	AD0013	6.0 mg
B.adolescentis	AD0053	7.2 mg
B.breve	AD0054	6.5 mg
B.longum	AD0057	5.1 mg

(2) ICR Mice (male, 6 weeks of age, average body weight 30.5 ± 0.6 g) were used. The sterilized cells prepared according to the above method for preparing thermally

sterilized cells were intraperitoneally administered in the 3 serial cell numbers of 9×10^9 , 9×10^8 and 9×10^7 cells per a mouse (10 mice in each group) as a suspension in physiological saline (0.5 ml), and the life and death of mice were observed for 14 days.

The LD₅₀ value (cell number/mouse) calculated according to the Behreus-Kärber method was 6×10^9 cells/mouse or more (intraperitoneal application) in any bacteria. When administered orally or applied to the skin, no toxicity was observed practically in any cases.

Examples of Use

1. Facial cleansing cream

Fatty acid	36
Oleyl alcohol	1.5
Lanoline derivative (E.O. addition product)	1.0
Glycerin	18.0
Potassium hydroxide	6.0
Water extract of the invention	0.1-1.0
Perfume	0.5
Antiseptic	proper amount
Purified water	36-36.9
	100 wt%

2. Bath preparation

Triethanolamine lauryl sulfate	40
Sodium lauryl sulfate	5
Lauroyl sodium sarcosinate	3
Sodium lauryl imidazolidine carboxylate	10
Lauric acid diethanolamide	5

Disodium ethylenediaminetetraacetate	0.3
Sodium hexametaphosphate	1
Propylene glycol	10
Water extract of the invention	1-5
Perfume, pigment, antiseptic	proper amount
Purified water	31-35
	100 wt%

3. Liniment

Ethyl lactate	10 ml
Glycerin	5-10 ml
Water extract of the invention	1-5 g
Ethanol	Total 100 ml

4. Ointment

Resorcin	6 g
Zinc oxide	6 g
Bismuth subnitrate	6 g
Juniper tar	2 g
Bee wax	10 g
Yellow petrolatum	27 g
Purified lanolin	26 g
Glycerin	13 g
Water extract of the invention	4 g

4. Brief Description of Drawings

Fig. 1 shows the inhibitory action of Streptococcus on the growth process of P. acnes in comparison, wherein the horizontal axis indicates the time of culture, and the vertical axis indicates the number of live cells (log/ml) of P. acnes.

Fig. 2 shows the results examined on the inhibitory action of S. faecium AD1005 against the growth of P. acnes,

wherein the horizontal axis indicates the time of culture, and the vertical axis indicates the number of live cells (log/ml) of *P. acnes*.

Applicant: ADVANCE Co., Ltd.

Fig. 1

コントロール : Control

S. フェカーリス : *S. faecalis*

S. エビウム : *S. avium*

S. デュランス : *S. durans*

S. フェシウム : *S. faecium*

生菌数 : Number of live cells

培養時間 (時間) : Culture time (hr)

Fig. 2

コントロール : Control

蛋白質濃度 : Protein concentration

同 : ditto

生菌数 : Number of live cells

培養時間 (時間) : Culture time (hr)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-179829

(43)Date of publication of application : 23.07.1988

(51)Int.Cl.

A61K 35/74
A61K 35/74

(21)Application number : 62-009925

(71)Applicant : ADVANCE CO LTD

(22)Date of filing : 21.01.1987

(72)Inventor : OKAZAKI HIDE

(54) ANTIBACTERIAL AGENT FOR SKIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the titled antibacterium agent containing bacterium cell of a microorganism belonging to the genus Streptococcus, etc., and/or water- extracted product thereof as an active ingredient.

CONSTITUTION: A bacterium cell of microorganism belonging to the genus Streptococcus, Lactobacillus or Bifidobacterium (e.g. Streptococcus faecium, Streptococcus durans, Streptococcus avium, Streptococcus faecalis, Lactobacillus brevis, Lactobacillus salivarius, Bifidobacterium adolescentis, etc.) and/or water- extracted product thereof is included as an active ingredient to provide the aimed antibacterial agent for skin. The agent has strong antibacterial property to Propionibacterium acnes which is an acne-genic-originated bacterium. The agent includes various kinds of cosmetic such as bathing agent or cosmetic for bath, facial-cleansing agent, anti-suntan cream, hair fixing agent, and, composition for skin coating, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-179829

⑬ Int. Cl.⁴

A 61 K 35/74

識別記号

ADZ
ADA

庁内整理番号

8615-4C

⑭ 公開 昭和63年(1988)7月23日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑮ 発明の名称 皮膚用抗菌剤

⑯ 特 願 昭62-9925

⑰ 出 願 昭62(1987)1月21日

⑱ 発 明 者 岡 崎 秀 神奈川県相模原市下九沢767

⑲ 出 願 人 株式会社 アドバンス 東京都中央区日本橋小舟町5番7号

明 細 書

1. 発明の名称

皮膚用抗菌剤

2. 特許請求の範囲

- (1) ストレプトコッカス属、ラクトバチルス属又はビフィドバクテリア属に属する微生物の菌体及び／又は水抽出物を有効成分として含有することを特徴とする皮膚用抗菌剤。
- (2) 前記微生物がストレプトコッカス・フェシウム、同デュランス、同エビウム、同フェカーリス、ラクトバチルス・プレビス、同サリヴァリウス、ビフィドバクテリウム・アドレセンテス、同プレベ、同ロンガムであることを更に特徴とする特許請求の範囲第(1)項に記載の皮膚用抗菌剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は有効成分としてストレプトコッカス

属に属する微生物、ラクトバチルス属に属する微生物／又はビフィドバクテリウム属に属する微生物の菌体及び／又は水抽出物を含有する皮膚用抗菌剤、特に抗痤疮剤、皮膚疾患改善剤乃至皮膚保護剤に関する。

主たる痤疮(にきび *acne*)の原因菌であるプロピオニバクテリウム・アクネス(*Propionibacterium acnes*又は*Corynebacterium parvum*)に対する抗菌性物質としては、hexachloropheneなどがあるが、人体ならびに腸内細菌に対する影響等の副作用につき実質的に未解明であり、皮膚塗布による皮膚吸収及び経口による体内への侵入に対し、必ずしも安全であるとはなし難いものである。

上記に鑑み本発明者らは鋭意研究の結果、健康人腸内細菌由来の乳酸菌であるストレプトコッカス属、ラクトバチルス属、又はビフィドバクテリウム属に属する微生物の菌体乃至その水抽出物が、プロピオニバクテリウム・アクネスに対し強い抗菌活性を有すること、及びこれら乳

酸菌菌体乃至水抽出物は腸内細菌や皮膚に対する影響を含めて、経口投与或いは皮膚塗布実験の結果、実質的に全然無毒性であることを知見し、本発明に到達したものである。

以下、本発明に於いて使用され得る微生物の種類と菌学的性質、スクリーニング方法、菌体調製法、及び薬理作用等につき詳細に分説する。

微生物

ストレプトコッカス属、ラクトバチルス属又はビフィドバクテリウム属に属する微生物であり、就中、ストレプトコッカス・フェシウム(*Streptococcus faecium*)、同デュランス(*S. durans*)、同エビウム(*S. avium*)、同フェカリス(*S. faecalis*)、ラクトバチルス・ブレビス(*Lactobacillus brevis*)、同サリヴァリウス(*L. salivarius*)、ビフィドバクテリウム・アドレセンテス(*Bifidobacterium adolescentis*)、同ブレベ(*B. breve*)、同ロングム(*B. longum*)等を好適なものとして例示し得る。ここで本発

明に於いて特に有用な菌株を微工研受託番号と共に表示すれば下記の第1表の通りである。

第1表

菌株名	受託番号
<i>Streptococcus faecium</i>	AD1005 FERM P-8697
<i>Streptococcus avium</i>	AD2001 FERM P-8698
<i>Streptococcus durans</i>	AD3003 FERM P-8699
<i>Streptococcus faecalis</i>	AD9002 FERM P-8696
<i>Lactobacillus brevis</i>	AD0012 FERM P-8695
<i>Lactobacillus salivarius</i>	AD0013 FERM P-8694
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	AD0053 FERM P-8693
<i>Bifidobacterium breve</i>	AD0054 FERM P-8692
<i>Bifidobacterium longum</i>	AD0057 FERM P-8691

-3-

菌学的性質

本発明微生物のスクリーニング法、同定など菌学的性質につき要約して示せば次の通りである。

1. スクリーニング方法

Watanabe, T., et al., Studies on streptococci, I. Distribution of fecal streptococci in man. Microbiol. Immunol. 25, 257-269 (1981)に記載の方法に準ずる。すなわち、上記文献に記載の通り、健康人の糞便を下記の組成(第2表)の希釈液で希釈し、ストレプトコッカスはKMN agar [vander Heil-Korstanje, J. A., and R. C. Winkler: J. Med. Microbiol. 8, 491(1975): 第3表]、ラクトバチルスはLBS agar [EBL, 第4表]、ビフィドバクテリウムはMPH agar [Tanaka, R. et al., Appl. Environ. Microbiol. 40, 866-869(1980), 第5表]に塗抹、37℃、好氣的乃至嫌氣的条件下で48-72時間培養し、生成コロニーをカウント、無作為に

-4-

ひろい、コロニー形、カタラーゼ活性(陰性)、グラム染色陽性球菌及び桿菌を分離し、生理的、生化学的性状を検査して分類同定した。

第2表

希釈液の組成

KH ₂ PO ₄	4.5g
Na ₂ HPO ₄	6.0g
L-システイン塩酸塩	0.5g
ツイーン80	0.5g
寒天	1.0g
精製水	1000ml

第3表

KMNagar(Red-Kanamycin-milk agar)の組成

トリプトース	15g
肉エキス	3g
アジ化ナトリウム	0.2g pH6.8
食塩	5g 121℃ 10分間
寒天	18g
精製水	800ml

-5-

-156-

-6-

スキムミルク	16g
B ニュートラルレッド	40mg 100℃ 1時間
精製水	200ml
C カナマイシン	24mg
A, B, Cを別滅菌後、合し、平板とする。	

第4表

LBSagarの組成(BBL)

トリプトース	10g
肉エキス	5g
KH ₂ PO ₄	6g
クエン酸三アンモニウム	2g
グルコース	20g
無水酢酸ナトリウム	15g
ツイーン80	1g
H ₂ SO ₄ ・7H ₂ O	575mg
MnSO ₄ ・2H ₂ O	120mg
FeSO ₄ ・7H ₂ O	34mg
寒天	15g
精製水	100ml pH5.5
121℃ 15分間 加熱滅菌	

-7-

3% L-システイン塩酸塩	1ml
ナリジクス酸	10mg
1.6% ブロムクレゾールパープル	0.1ml
寒天	2g
精製水	100ml pH6.8
100℃ 30分間 圧力なし加熱滅菌	

2. 分離乳酸菌の同定

本発明微生物の一般的菌学的性質は同一分類につき、公知各文献の示すものと同一の諸性質を有する。

すなわち、ストレプトコッカス属細菌の選択培地KHNagar培地、ラクトバチルス属細菌の選択培地LBSagar培地、そしてビフィドバクテリウム属細菌の選択培地HPNagar培地上のコロニー形状、グラム染色性、形態、生理生化学的性状により下記文献1)~4)を参照して同定した。

参考文献

- 1) 光岡知足：日本細菌学雑誌、24(6)、261-280(1969)

第5表

MPNagarの組成

ラクトース	2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
K ₂ HPO ₄	0.1g
H ₂ SO ₄ ・7H ₂ O	20mg
FeSO ₄ ・7H ₂ O	1mg
MnSO ₄ ・2H ₂ O	0.8mg
食塩	1g
0.1% リサズリン	0.1mg
ビオチン	0.01mg
パン・トレン酸カルシウム	0.2mg
リボフラビン	0.1mg
アデニン	0.1mg
グアニン	0.1mg
キサンチン	0.1mg
ウラシル	0.1mg
ツイーン80	0.1g
10% ビルビン酸	0.1ml
8% Na ₂ CO ₃	5ml

-8-

- 2) Poupard, J. A., Hussin, I. and Norris, R. F., : Bacteriol. Rev., 37 136-165 (1973)
- 3) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. 490-676(1974)
- 4) 光岡知足：臨床と細菌、2(3)、55(197)-97(239), (1975)

ここで同定の根拠としたその主な菌学的性状を要約して示せば、第6乃至第8表の通りである。

(以下余白)

グルコース	20.0g
L-システイン塩酸塩	0.2g
塩類溶液(※)	5.0ml
(pH7.0, 121℃ 15分間 加熱滅菌)	

(※) 酢酸ナトリウムはストレプトコッカス
の場合は不要

(※※) 塩類溶液 蒸留水100ml中に

$\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11.5g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.68g
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.4g

(注2) CAM 液体培地組成

CAMブイヨン「日本製薬株式会社」コード05422

	59.0g(12分)
ペプトン	10.0g
ダイズペプトン	3.0g
プロテオースペプトン	10.0g
消化血清末	13.0g
酵母エキス	5.0g

-15-

るものであるが、その典型的調製方法の幾つか
につき例示すれば次の通りである。

1. 熱水抽出処理

採集された菌体を80~130℃(より好ましくは
100~120℃)、数分~数時間滅菌を兼ねた加圧
乃至非加圧熱水抽出処理に付し、遠心分離処理
等により、不溶固形分を除去して目的活性成
分である水溶性成分が得られる。尚、抽出溶媒
としては通常の生理食塩水(0.9%NaCl水溶液等)
のみならず、所定pH値に調整された各種緩衝液、
各種塩類溶液、水/アルコール>1/2(重量比)
の程度の水:アルコール(ノタノールとエタノール)
混合溶媒等、各種水性溶媒、水のみも又
同様に使用され得る。

更に採集菌体を前記滅菌熱水抽出処理に付し
た全体を、遠心分離等の固形分除去処理に更に
付することなくそのまま凍結乾燥、減圧乾燥、
噴霧乾燥粉末等としたものも又、本発明皮膚用
抗菌剤として有用なものであることが付言され
る。

肉エキス	2.2g
肝臓エキス末	1.2g
グルコース	3.0g
KH_2PO_4	2.5g
塩化ナトリウム	3.0g
溶性デンプン	5.0g
L-システイン塩酸塩	0.3g
チオグリコール酸ナトリウム	0.3g

(pH7.3±0.1, 115℃ 15分間 加熱滅菌)

得られた菌体は生菌体又は加熱処理等による
死菌体として、いずれもそのまま薬剤として利
用することができるが、超音波処理等により破
壊菌体として利用に供されてもよい。したがっ
て、本発明に於ける「死菌体」とはこれら破壊菌
体の全部又は一部分をも包含するものである。

皮膚用抗菌剤の調製

本発明皮膚用抗菌剤は前記各微生物の各種滅
菌処理菌体又はその水抽出成分を有効成分とす

-18-

2. 滅菌処理

採集菌体を噴霧乾燥等の加熱滅菌処理し、或
いは超音波破壊処理(例えば、15kc, 60分)した
各種滅菌処理菌体も又、本発明皮膚用抗菌剤の
有効成分として使用され得る。更に、これら滅
菌処理菌体を水抽出処理に付し、その水溶性成
分とし、目的活性成分を得るようにしてよい。

抗菌活性

1. 抗菌活性

後記実験例に示す通り、本発明皮膚用抗菌剤
はプロピオニバクテリウム属中の痤疮症の原因
菌となる菌の増殖を極めて効果的に抑制乃至阻
害する。他方、腸内細菌の主要乳酸菌(ストレ
プトコッカス・フェカリス、同フェシウム、
ラクトバチルス・アシドフィルス、同サリグ
リウス、同ブレビス、ビフィドバクテリウム・
アドレセンテス、同ブレベ)には実質的に阻害
効果を有しないという選択特異的抗菌スペクト
ルを示す。

-17-

-159-

-18-

2. 毒性

経口では実質的に全然無毒性であり、そのLD₅₀値は熱水抽出物乃至滅菌体として約5mg/マウス以上であった。

3. 使用態様

本発明皮膚用抗菌剤は沐浴剤乃至浴用化粧剤、洗顔料、日焼け止めクリーム、整髪・頭皮料、口紅・頬紅等々の各種化粧品、皮膚塗布用組成物として、或いは皮膚消毒剤に添加されて皮膚疾患改善乃至皮膚保護性塗布粉末或いはクリーム状の形態で好適に使用され得るものであるが、その使用量は処理菌体乃至水抽出物として通常0.001~10重量%(乾燥重量換算)程度である。

以下、実験例により本発明をより詳細に説明する。

実験例1

プロピオニバクテリウム・アクネス(Propionibacterium acnes: 1640001, 阪大微生物株保存施設より分与)の増殖阻害作用

ロゴサ(Rogosa)液体培地或いはCAN液体培地に、生菌数濃度およそ 10^6 /mlとなるように、本発明各乳酸菌を接種し、好氣的或いは嫌氣的条件下で15~24時間37℃で培養した。培養後、遠心分離により集菌し、集菌菌体を約10容の生理食塩水に懸濁し、再び集菌する事を2回繰り返し、洗浄菌体を集めた。これを1容の蒸留水中に懸濁し、110~120℃で10~15分間オートクレーブで加熱した。次いで遠心分離を行い、その上清そのまま或いはその凍結乾燥を試料とした。上記、試料を含有するCAN agar培地(注)を嫌気状態にして、嫌気下にプロピオニバクテリウム・アクネスを約 10^2 接種し培養した。48時間後の生成したコロニー数をカウントし、試料を含まないコントロールと比較して抑制率を測定した。その結果を第9表に示した。

(以下余白)

-19-

-20-

以上の結果より明らかなように、S.フェシウム、S.デュランス、B.アドレセンテスの3種はP.アクネスの増殖を強力に抑制し、他の6種も増殖を阻害した。

これら9種のうち、特にS.フェシウムAD1005は、コントロール(すなわち菌体抽出液のうちの溶媒である水のみ添加群である)にプレート当たり441個のP.アクネスコロニーを生ずるのに対し、プレート当たり1個とほぼ100%、P.アクネスの増殖を抑える程の制菌能をも示した。

実験例2

P.アクネス増殖過程に及ぼすストレプトコッカス属の抑制作用比較

実験例1と同様に調製した試料を含有するCAN液体培地を嫌気状態にして、嫌気下にP.アクネスを 10^4 /ml接種し培養した。そして、0, 6, 12, 24, 30時間後の生菌数(/ml)を測定した。その結果は第1図に示した。S.フェシウム、S.デュランス、S.エビウム、S.フェカ

第9表

菌	種	菌数/プレート	抑制率
Control		441	99.8%
<i>Streptococcus faecalis</i> AD 1005		1	90.9%
<i>Streptococcus faecalis</i> AD 1006		40	59.6%
<i>Streptococcus avium</i> AD 2001		178	67.3%
<i>Streptococcus durus</i> AD 3003		56	33.6%
<i>Streptococcus faecalis</i> AD 9002		293	59.0%
<i>Lactobacillus brevis</i> AD 0012		181	75.5%
<i>Lactobacillus salivarius</i> AD 0013		108	83.7%
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> AD 0053		72	44.7%
<i>Bifidobacterium breve</i> AD 0054		244	74.0%
<i>Bifidobacterium longus</i> AD 0057		114	

-21-

-160-

-22-

ーリスの順でP.アクネスの増殖を抑制した。S.フェシウムAD1005においては30時間近くの間、P.アクネスの増殖を抑制した。そして12～15時間は0時の数より減少させ、制菌能をも示した。

ここで省略したが、B.アドレセンテスAD0053にも、S.デュランスとはほぼ同様な結果を示すことをつけ加えておく。

· 实例 3

**S.フェシウムAD1005によるプロピオニバクテ
リウム・アクネスの増殖阻害作用**

S. フェシウム AD1005 について、実験例 1 と同様に調製した菌体水抽出液を乾燥菌体重量において 3 段階温度別にして GAN 液体培地に含有させ、実験例 2 と同様な方法で行った。その結果を第 2 図に示した。

図に示す通り、濃度(蛋白量)に比例してP、
アクネスの増殖を抑制し、培養12時間位まで抑

制能が著明であつた。

抗菌スペクトル

前記各熱水抽出物を添加した常法によりヒト腸内細菌(各種乳酸菌及び大腸菌)への影響を試験した結果を下記第10表に要約して示す。表から、当該熱水抽出物は主要な腸内細菌に対して不活性であると認められる。

(以下余白)

-23-

[illegible]

(注) - : 阻害なし, + : 阻害あり

-24-

急性毒性

① ICR系マウス(雄6週令、平均体重33.0±0.5g)を使用し、前記熱水処理抽出物の製法に従って調製した熱水抽出物をマウス当り 9×10^1 、 9×10^2 、 9×10^3 個の3段階の出発菌数(各群10匹)に相当量でその生理食塩水、0.5%胎卵液を腹腔内投与し、14日間マウスの生死を観察した。

Behrens-Kürber法に従って算出したLD₅₀値 (mg/マウス)を第11表に示す。尚、連日経口投与、皮膚塗布では、いずれの場合でも全然無毒性であった。

第11表

菌株名	LD ₅₀ (mg/マウス)
S. フェシウム AD1005	7.4mg
S. エピウム AD2001	7.3mg
S. デュランヌ AD3003	6.8mg
S. フェカーリス AD9002	7.0mg
L. プレビス AD0012	6.6mg
L. サリファリウス AD0013	6.0mg
B. フレセンテス AD0053	7.2mg
B. プレベ AD0054	6.5mg
B. ロングム AD0057	5.1mg

- 25 -

—161—

- 26 -

② ICR系マウス(雄6週令、平均体重 30.5 ± 0.6 g)を使用し、前記加熱滅菌体制製例に従って得られた滅菌体をマウス当り 9×10^3 、 9×10^4 、 9×10^5 個の3段階の菌体相当(各群10匹)でその生理食塩水0.5ml懸濁液を腹腔内投与し、14日間マウスの生死を観察した。

Behrens-Kärber法に従って算出したLD₅₀値(菌体個数/マウス)は、いずれの菌にあってても 6×10^3 個/マウス以上(腹腔内投与)であり、且つ経口投与、皮膚塗布ではいずれの場合でも実質的に全然無毒性であった。

使用例

1. 洗顔クリーム

脂肪酸	36
オレイルアルコール	1.5
ラノリン誘導体(E.O.付加物)	1.0
グリセリン	18.0
水酸化カリウム	6.0

-27-

3. 液状塗布剤

乳酸エチル	10ml
グリセリン	5~10ml
本発明水抽出物	1~5g
エタノール	全量で100ml

4. 軟膏剤

レゾルシン	6g
酸化亜鉛	6g
次硝酸ビスマス	6g
杜松モクタル	2g
ミツロウ	10g
黄色ワセリン	27g
精製ラノリン	26g
グリセリン	13g
本発明水抽出物	4g

本発明水抽出物	0.1~1.0
香料	0.5
防腐剤	適量
精製水	36~38.9
	100重量%

2. 沐浴剤

ラウリル硫酸トリエタノールアミン	40
ラウリル硫酸ナトリウム	5
ラウロイルサルコシン酸ナトリウム	3
ラウリルイミタゾリンジカルボン酸ナトリウム	10
ラウリル酸ジエタノールアミド	5
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム	0.3
ヘキサノタリン酸ナトリウム	1
プロピレングリコール	10
本発明水抽出物	1~5
香料、色素、防腐剤	適量
精製水	31~35
	100重量%

-28-

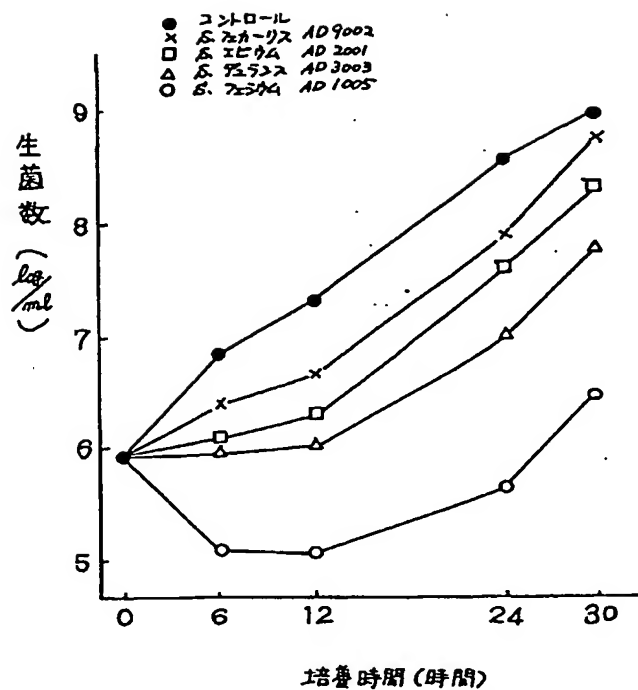
4. 図面の簡単な説明

第1図は、P.アクネス増殖過程に及ぼすトレプトコッカス属の抑制作用を比較したもので、横軸は培養時間、縦軸はP.アクネスの生菌数(log/ml)を示す。

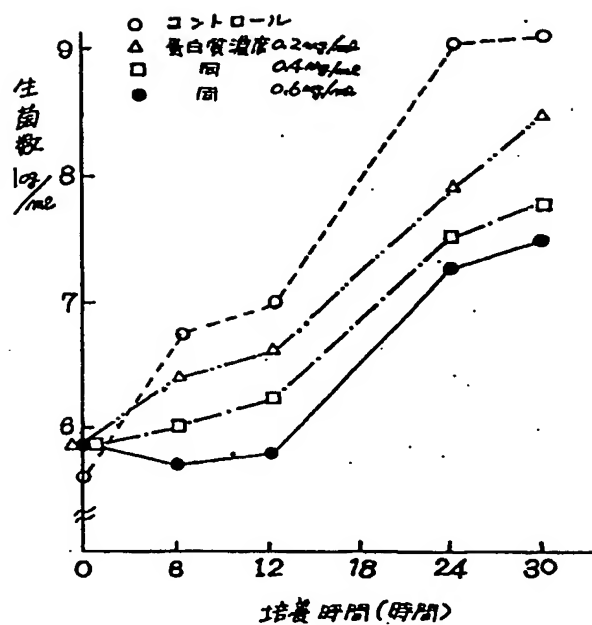
第2図は、S.フェシウムAD1005によるP.アクネスの増殖阻害作用を調べたもので、横軸は培養時間、縦軸はP.アクネスの生菌数(log/ml)を示す。

特許出願人 株式会社アドバンス

第1図



第2図



VERIFICATION OF TRANSLATION

RE: PUBLICATION OF UNEXAMINED JAPANESE PATENT APPLICATION
NO. Sho-63-179829

I, Kazunori Shibata, Toranomom East Bldg., 7-13, Nishi-Shimbashi
1-chome, Minato-ku, Tokyo, Japan, am the translator of Publication
of Unexamined Japanese Patent Application No. Sho-63-179829 and I
state that the following is a true translation to the best of my
knowledge and belief.

(Signature of Translator) Kazunori Shibata
(Date) This 11th day of October, 2007.

Specifidation

1. Title of the Invention

Antibacterial Agents for Skin

2. Claims

(1) An antibacterial agent for skin comprising as an active ingredient the cell and/or water extract of microorganism belonging to Streptococcus, Lactobacillus or Bifidobacterium.

(2) An antibacterial agent for skin as claimed in Claim (1), wherein said microorganism is Streptococcus faecium, S. durans, S. avium, S. faecalis, Lactobacillus brevis, L. salivarius, Bifidobacterium adolescentis, B. breve, or B. longum.

3. Detailed Description of the Invention

The present invention relates to antibacterial agents for skin, particularly, anti-acne agents, improvers for skin diseases or skin-protective agents, comprising as an active ingredient the cell and/or water extract of a microorganism belonging to Streptococcus, a microorganism belonging to Lactobacillus /or a microorganism belonging to Bifidobacterium.

As an antibacterial material effective against major

causative bacteria of acne (pimple), *Propionibacterium acnes* or *Corynebacterium parvum*, hexachlorophene and the like are known, of which the side effect such as an influence on the human body and intestinal bacteria, however, has not yet been elucidated, and thus these do not always seem to be safe in absorption from the skin applied or invasion into the body by oral administration.

In the above-mentioned situation, the present inventors worked assiduously and found that the cells or water extracts of lactic acid bacteria derived from the intestinal bacteria of healthy persons, that is, microorganism belonging to *Streptococcus*, *Lactobacillus* or *Bifidobacterium*, have a potent antibacterial action against *Propionibacterium acnes*, and the cells of these lactic acid bacteria or water extract thereof are totally innoxious in the tests of oral administration or application to the skin, including the influence on intestinal bacteria or skin. Thus, the invention was completed.

The species and bacteriological properties, screening method, method for preparing the cells, and pharmacological actions, of the microorganisms used in the invention will be explained in detail as follows.

Microorganisms

Exemplary and preferred microorganism includes those

belonging to Streptococcus, Lactobacillus or Bifidobacterium, particularly, Streptococcus faecium, S. durans, S. avium, S. faecalis, Lactobacillus brevis, L. salivarius, Bifidobacterium adolescentis, B. breve, and B. longum. Table 1 summarizes the strains particularly useful in the invention together with the FERM P Accession Number.

Table 1

Name of Strain		Accession No.
Streptococcus faecium	AD1005	FERM P-8697
Streptococcus avium	AD2001	FERM P-8698
Streptococcus durans	AD3003	FERM P-8699
Streptococcus faecalis	AD9002	FERM P-8696
Lactobacillus brevis	AD0012	FERM P-8695
Lactobacillus salivarius	AD0013	FERM P-8694
Bifidobacterium adolescentis	AD0053	FERM P-8693
Bifidobacterium breve	AD0054	FERM P-8692
Bifidobacterium longum	AD0057	FERM P-8691

Bacteriological Properties

The screening method and bacteriological properties such as identification of the microorganisms of the invention are summarized as follows.

1. Screening Method

Screening was carried out in accordance with the method described in Watanabe, T., et al., Studies on streptococci, I. Distribution of fecal streptococci in man, Microbiol. Immunol. 25, 257-269 (1981). According to the description of the above-cited reference, the feces of a healthy person were

diluted with a diluent solution of the following component (Table 2); Streptococcus was smeared on a KMN agar [vander Weil-Korstanje, J.A.A., and K.G. Winkder: J. Med. Microbiol. 8 491 (1975); Table 3]; Lactobacillus was on an LBS agar [BBL, Table 4]; and Bifidobacterium was on an MPN agar [Tanaka, R. et al., Appl. Environ. Microbiol. 40, 866-869 (1980); Table 5], respectively; they were cultured at 37°C in an aerobic or anaerobic condition for a period of 48 to 72 hours; the generated colonies were counted and collected at random, and the shape of the colony and their catalase activity (negative) were confirmed; the gram-stain positive cocci and bacilli were isolated, respectively, and their physiological and biochemical properties were examined for classification and identification.

Table 2

Components of the diluent solution

KH ₂ PO ₄	4.5 g
Na ₂ HPO ₄	6.0 g
L-Cysteine hydrochloride	0.5 g
Tween 80	0.5 g
Agar	1.0 g
Purified water	1000 ml

Table 3

Components of KMN agar (Red-Kanamycin-milk agar)

	Tryptose	15 g	
	Meat extract	3 g	
A	Sodium azide	0.2 g	pH 6.8
	Common salt	5 g	121°C, 10 min
	Agar	18 g	
	Purified water	800 ml	
	Skim milk	16 g	
B	Neutral red	40 mg	100°C, 1 hr
	Purified water	200 ml	
C	Kanamycin	24 mg	

A, B and C were respectively sterilized, combined and made into a plate.

Table 4

Components of LBS agar (BBL)

	Tryptose	10 g	
	Meat extract	5 g	
	KH ₂ PO ₄	6 g	
	Triammonium citrate	2 g	
	Glucose	20 g	
	Anhydrous sodium acetate	15 g	
	Tween 80	1 g	
	MgSO ₄ 7H ₂ O	575 mg	
	MnSO ₄ 2H ₂ O	120 mg	
	FeSO ₄ 7H ₂ O	34 mg	
	Agar	15 g	
	Purified water	100 ml	pH 5.5

Sterilized under heating at 121°C for 15 minutes

Table 5

Components of MPN agar

Lactose	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	20 mg
FeSO ₄ 7H ₂ O	1 mg
MnSO ₄ 2H ₂ O	0.8 mg
Common salt	1 mg
0.1% Risazurin	0.1 mg
Biotin	0.01 mg
Calcium pantothenate	0.2 mg
Riboflavin	0.1 mg
Adenine	0.1 mg
Guanine	0.1 mg
Xanthine	0.1 mg
Uracil	0.1 mg
Tween 80	0.1 g
10% Pyruvic acid	0.1 ml
8% Na ₂ CO ₃	5 ml
3% L-Cysteine hydrochloride	1 ml
Nalidixic acid	10 mg
1.6% Bromocresol purple	0.1 ml
Agar	2 g
Purified water	100 ml pH 5.8

Sterilized under heating at 100°C with no pressure for 30 minutes

2. Identification of Isolated Lactic Acid Bacteria

The typical bacteriological properties of the microorganisms of the invention are the same as described in the publicly known documents because they belong to the same classification.

That is, they were identified in reference to the

following documents 1) to 4) on the shape of colony, gram staining, morphology, and physiological and biochemical property when cultured on the KMN agar medium as a selective medium for Streptococcus bacteria, the LBS agar medium as a selective medium for Lactobacillus bacteria, and the MPN agar medium as a selective medium for Bifidobacterium bacteria.

Reference

- 1) Tomotari Mitsuoka, Nippon Saikingaku Zasshi (Journal of Bacteriology, Japan), 24(6), 261-280 (1969)
- 2) Poupard, J.A., Husain, I. and Norris, R.F., Bacteriol. Rev., 37 136-165 (1973)
- 3) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. 490-676 (1974)
- 4) Tomotari Mitsuoka, Rinsyo to Saikin (Clinical and Bacteria), 2(3), 55(197)-97(239), (1975)

The major bacteriological properties on which the identification has been made are as shown in Tables 6 to 8.

Table 6

	S. faecium AD1005	S. avium AD2001	S. durans AD3003	S. Faecalis AD9002
Gram stain (positive +)	+	+	+	+
Catalase (with boiled blood)	-	-	-	+
Growth at 10°C	+	+	+	+
Growth at 45°C	+	+	+	+
Growth at pH 9.6	+	+	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	+
Growth in 40% bile	+	+	+	+
Growth in 1/4000 tellurite	-	-	-	+
Growth in 0.1% methylene blue milk	+	UD	+	+
Carbohydrate fermentation				
Arabinose	+	+	-	-
Glycerin	-	+	-	+
Raffinose	-	+	-	-
Sorbitol	-	+	-	+
Xylose	+	+	-	+
Mannitol	+	+	UD	+
Esculin hydrolysate	+	+	+	+
Arginine hydrolysate	+	+	+	+

Remark) +: positive; -: negative; UD: undecided

Table 7

	L. brevis AD0012	L. salivarius AD0013
Gram stain	+	+
Catalase	-	-
Gas generation	+	-
Growth at 15°C	+	-
Growth at 45°C	-	+
Carbohydrate fermentation		
Arabinose	+	-
Xylose	+	-
Ribose	+	-
Mannose	-	+
Cellobiose	-	-
Raffinose	+	+
Melezitose	-	-
Starch	-	+
Mannitol	-	+
Salicin	-	-
Amygdalin	-	-
Rhamnose	-	+
Remark) +: positive; -: negative		

Table 8

	B. adolescentis AD0053	B. breve AD0054	B. longum AD0057
Gram stain	+	+	+
Gas generation from glucose	-	-	-
Carbohydrate fermentation			
Arabinose	+	-	+
Xylose	+	-	+
Mannose	+	-	-
Cellobiose	+	+	±
Raffinose	+	+	+
Melezitose	+	-	±
Mannitol	+	+	-
Sorbitol	+	+	+
Salicin	+	+	-
Amygdalin	+	-	-
Inulin	+	-	±
Trehalose	+	-	-
Ribose	+	+	+

Remark) +: positive; ±: pseudo-positive; -: negative

3. Culture Method

These microorganisms are cultured in a conventional manner as shown in the above respective documents; for example, the microorganisms of Streptococcus and Lactobacillus may be cultured on a Rogosa liquid medium (Note 1), and the microorganism of Bifidobacterium on a GAM liquid medium (Note 2); Streptococcus and Lactobacillus may be cultured aerobically or anaerobically, and Bifidobacterium anaerobically. The resulting culture broth is subjected to centrifugation to recover the cells.

(Note 1) Components of the Rogosa liquid medium

In 1L of distilled water

Trypticase	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
Tryptose	3.0 g
K ₂ HPO ₄	3.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
Sodium acetate(*)	1.0 g
Triammonium citrate	2.0 g
Tween 80	1.0 g
Glucose	20.0 g
L-Cysteine hydrochloride	0.2 g
Salt solution(**)	5.0 ml

(pH 7.0, sterilized under heating at 121°C for 15 minutes)

(*) Sodium acetate is not necessary for Streptococcus

(**) Salt solution contains the followings in 100 ml of distilled water.

MgSO ₄ 7H ₂ O	11.5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.68 g
MnSO ₄ 2H ₂ O	2.4 g

(Note 2) Components of the GAM liquid medium

GAM bouillon (Nissui Pharm. Co.) Code 05422	59.0 g (for 1L)
Peptone	10.0 g
Soybean peptone	3.0 g
Proteose peptone	10.0 g
Digested serum powder	13.0 g
Yeast extract	5.0 g
Meat extract	2.2 g
Liver extract powder	1.2 g
Glucose	3.0 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
Sodium chloride	3.0 g
Soluble starch	5.0 g
L-Cysteine hydrochloride	0.3 g
Sodium thioglycolate	0.3 g

(pH 7.3±0.1, sterilized under heating at 115°C for 15 minutes)

The resulting cells may be used as pharmaceuticals as such in a form of live cells or thermally treated killed cells, or alternatively they may be utilized as destroyed cells treated by ultra-sonication, etc. Therefore, the "killed cells" of the invention also include the whole or part of these destroyed cells.

Preparation of antibacterial agents for skin

The antibacterial agent for skin of the invention comprises the sterilized cells or water extract of a variety of the above-described microorganisms as an active ingredient. Some of the typical methods for preparation of the agents are exemplified as follows.

1. Extraction with Hot Water

The collected cells are subjected to extraction with hot water at 80-130°C (more preferably, 100-120°C) under or without pressure for a period of several minutes to several hours, during which time sterilization is also achieved. Water-insoluble solid portion is removed by centrifugal separation to give a water-soluble fraction containing the objective active ingredient. The solvent used for extraction includes not only usual physiological saline (0.9% NaCl aqueous solution) but also a variety of buffers adjusted at a defined pH, a variety of salt solutions, a water/alcohol (methanol or ethanol) mixture of 1 : 2 or more (by weight) or around, a variety of aqueous solvents, as well as water alone.

In addition, the whole of the collected cells which have been subjected to extraction and sterilization with hot water as mentioned above, without any treatment for removal of the solid portion by centrifugation, may be directly lyophilized or dried under reduced pressure or by spraying to give dry powder, which can be used as an antibacterial agent for skin in the invention.

2. Treatment for Sterilization

A variety of sterilized cells obtained from the collected cells by thermal sterilization such as spray drying or by destruction by ultra-sonication (e.g., 15 kc, 60 minutes) may be employed as active ingredient for the antibacterial agent

for skin of the invention. Further, the sterilized cells may be subjected to extraction with water to yield a water-soluble material as the objective active fraction.

Antibacterial Activity

1. Antibacterial Activity

As shown in the experimental examples below, the antibacterial agent for skin of the invention suppresses or inhibits very effectively the growth of causative bacteria of acne belonging to *Propionibacterium*. On the other hand, the agent shows such a selective and specific antibacterial spectrum that it has practically no inhibitory effect against major lactic acid bacteria (*Streptococcus faecalis*, *S. faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. brevis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. breve*) in the intestinal bacteria.

2. Toxicity

In oral administration, the agent is practically quite innoxious. The LD₅₀ value was about 5 mg/mouse or more as hot water extract or sterilized cells.

3. Form of Use

The antibacterial agent for skin of the invention may be preferably used as a variety of cosmetics including bath preparations or bath cosmetics, facial wash, sunburn cream, hair or head skin tonics, lip sticks, rouge and the like as

well as a composition to be applied to skin or in the form of a dermatologic disorder improving or skin protective coating powder or cream while being added to a skin disinfectant. The amount to be used as the processed cells or their water extract is approximately 0.001-10 wt % (calculated in terms of the dry weight).

The following Experimental Examples will explain the invention in more detail.

Experimental Example 1

Growth inhibitory action of *Propionibacterium acnes*: 1640001 (provided by Research Institute for Microbial Diseases, Microbes Depository Unit, Osaka University)

The respective lactic acid bacteria of the invention were inoculated on the Rogosa liquid medium or GAM liquid medium so that the live cell concentration was approximately 10^6 /ml, and cultured under an aerobic or anaerobic condition at 37°C for a period of 15-24 hours. After completion of the culture, the cells were collected by centrifugation, then suspended in about 10 parts by volume of physiological saline and collected again; this operation was repeated twice to obtain washed cells. The cells were suspended in 1 part by volume of distilled water, and heated in an autoclave at 110-120°C for 10-15 minutes. Then, centrifugation was carried out, and the supernatant was used as a sample as such or as lyophilizate. The GAM agar medium (Note) containing the above sample was placed under an

anaerobic condition, on which *Propionibacterium acnes* (about 10^3) was inoculated and cultured under an anaerobic condition. After the lapse of 48 hours, the number of colonies produced was counted and compared with that from the control containing no sample, and the inhibition ratio was determined. Table 9 shows the results.

Table 9.

Species	Cell number/plate	Inhibition ratio
Control	441	-
<i>Streptococcus faecium</i> AD 10C5	1	99.8%
<i>Streptococcus faecium</i> AD 10C5	40	90.9%
<i>Streptococcus avium</i> AD 2001	178	59.6%
<i>Streptococcus durans</i> AD 3003	56	87.3%
<i>Streptococcus faecalis</i> AD 9002	293	33.6%
<i>Lactobacillus brevis</i> AD 0012	181	59.0%
<i>Lactobacillus salivarius</i> AD 0013	108	75.5%
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> AD 0053	72	83.7%
<i>Bifidobacterium breve</i> AD 0054	244	44.7%
<i>Bifidobacterium longum</i> AD 0057	114	74.1%

As clearly seen from the above results, 3 species of *S. faecium*, *S. durans* and *B. adolescentis* strongly inhibited the growth of *P. acnes*, and the other 6 species also inhibited the growth.

Among these 9 species, particularly, *S. faecium* AD1005 allowed formation of only one colony of *P. acnes* per plate, in contrast to the control (i.e., the group to which only water, which is the solvent of the cell extract, was added) in which 441 colonies per plate were formed, indicating that *S. faecium* has so strong bacteriostatic action that the growth of *P. acnes* is inhibited approximately 100%.

Experimental Example 2

Comparison of the inhibitory action of *Streptococcus* on the growth process of *P. acnes*

A GAM liquid medium containing a sample prepared in the same manner as in Experimental Example 1 was placed under an anaerobic condition, on which *P. acnes* was inoculated at 10^6 /ml and cultured under an anaerobic condition. After the lapse of 0, 6, 12, 24, and 30 hours, the number of live cells (/ml) was counted. Fig. 1 shows the results. *S. faecium*, *S. durans*, *S. avium*, and *S. faecalis* inhibited in this order the growth of *P. acnes*. *S. faecium* AD1005 inhibited the growth of *P. acnes* over nearly 30 hours. The number of cells after 12-15 hours was less than that at 0 hour, indicating that the sample shows

a bacteriostatic action.

Though not indicated herein, it should be added that *B. adolescentis* AD0053 also shows nearly the same result as *S. durans*.

Experimental Example 3

Inhibitory action of *S. faecium* AD1005 against the growth of *Propionibacterium acnes*

For *S. faecium* AD1005, the water extract solution of cells prepared in the same manner as in Experimental Example 1 was made 3 serial concentrations by weight of dry cells, which were added to the GAM liquid medium and treated in the same manner as in Experimental Example 2. Table 2 shows the results.

As shown in the figure, the growth of *P. acnes* was inhibited in proportion to the concentration (amount of protein). The inhibition ability sustained clearly up to around 12 hours after cultivation.

Antimicrobial Spectrum

The above-mentioned extract with hot water was added to intestinal bacteria (various lactic acid bacteria and *Escherichia coli*), and the effect was examined in a usual way. The following Table 10 summarizes the results. As seen from Table, it is recognized that the extract with hot water is inactive to the major intestinal bacteria.

Table 10

Test Strain	Extracted Strain						
	S.faecium AD1005	S.avium AD2001	S.durans AD3003	S.faecalis AD9002	B.adolescentis AD0053	L.salivarius AD0013	
S.faecium	-	-	-	-	-	-	-
S.durans	-	-	-	-	-	-	-
S.avium	-	-	-	-	-	-	-
S.faecalis	-	-	-	-	-	-	-
S.mitis	-	-	-	-	-	-	-
L.acidophilus	-	-	-	-	-	-	-
L.fermentum	-	-	-	-	-	-	-
B.adolescentis	-	-	-	-	-	-	-
B.breve	-	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli	-	-	-	-	-	-	-

Remark) -: no inhibition; +: positive inhibition

Acute Toxicity

(1) ICR Mice (male, 6 weeks of age, average body weight 33.0 ± 0.5 g) were used. The extract with hot water prepared according to the above hot water extraction method was intraperitoneally administered in the 3 serial starting cell numbers of 9×10^9 , 9×10^8 and 9×10^7 cells per a mouse (10 mice in each group) as a suspension in physiological saline (0.5 ml), and the life and death of the mice were observed for 14 days.

Table 11 shows the LD₅₀ value (mg/mouse) calculated according to the Behrens-Kärber method. When administered orally every day or applied to the skin, no toxicity was observed in any cases.

Table 11

Name of Strain		LD ₅₀ (mg/mouse)
S.faecium	AD1005	7.4 mg
S.avium	AD2001	7.3 mg
S.durans	AD3003	6.8 mg
S.faecalis	AD9002	7.0 mg
L.brevis	AD0012	6.6 mg
L.salivarius	AD0013	6.0 mg
B.adolescentis	AD0053	7.2 mg
B.breve	AD0054	6.5 mg
B.longum	AD0057	5.1 mg

(2) ICR Mice (male, 6 weeks of age, average body weight 30.5 ± 0.6 g) were used. The sterilized cells prepared according to the above method for preparing thermally

sterilized cells were intraperitoneally administered in the 3 serial cell numbers of 9×10^9 , 9×10^8 and 9×10^7 cells per a mouse (10 mice in each group) as a suspension in physiological saline (0.5 ml), and the life and death of mice were observed for 14 days.

The LD₅₀ value (cell number/mouse) calculated according to the Behreus-Kärber method was 6×10^9 cells/mouse or more (intraperitoneal application) in any bacteria. When administered orally or applied to the skin, no toxicity was observed practically in any cases.

Examples of Use

1. Facial cleansing cream

Fatty acid	36
Oleyl alcohol	1.5
Lanoline derivative (E.O. addition product)	1.0
Glycerin	18.0
Potassium hydroxide	6.0
Water extract of the invention	0.1-1.0
Perfume	0.5
Antiseptic	proper amount
Purified water	36-36.9
	100 wt%

2. Bath preparation

Triethanolamine lauryl sulfate	40
Sodium lauryl sulfate	5
Lauroyl sodium sarcosinate	3
Sodium lauryl imidazolidine carboxylate	10
Lauric acid diethanolamide	5

Disodium ethylenediaminetetraacetate	0.3
Sodium hexametaphosphate	1
Propylene glycol	10
Water extract of the invention	1-5
Perfume, pigment, antiseptic	proper amount
Purified water	31-35
	100 wt%

3. Liniment

Ethyl lactate	10 ml
Glycerin	5-10 ml
Water extract of the invention	1-5 g
Ethanol	Total 100 ml

4. Ointment

Resorcin	6 g
Zinc oxide	6 g
Bismuth subnitrate	6 g
Juniper tar	2 g
Bee wax	10 g
Yellow petrolatum	27 g
Purified lanolin	26 g
Glycerin	13 g
Water extract of the invention	4 g

4. Brief Description of Drawings

Fig. 1 shows the inhibitory action of Streptococcus on the growth process of P. acnes in comparison, wherein the horizontal axis indicates the time of culture, and the vertical axis indicates the number of live cells (log/ml) of P. acnes.

Fig. 2 shows the results examined on the inhibitory action of S. faecium AD1005 against the growth of P. acnes,

wherein the horizontal axis indicates the time of culture, and the vertical axis indicates the number of live cells (log/ml) of *P. acnes*.

Applicant: ADVANCE Co., Ltd.

Fig. 1

コントロール : Control

S. フェカーリス : *S. faecalis*

S. エビウム : *S. avium*

S. デュランス : *S. durans*

S. フェシウム : *S. faecium*

生菌数 : Number of live cells

培養時間 (時間) : Culture time (hr)

Fig. 2

コントロール : Control

蛋白質濃度 : Protein concentration

同 : ditto

生菌数 : Number of live cells

培養時間 (時間) : Culture time (hr)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-179829

(43)Date of publication of application : 23.07.1988

(51)Int.Cl.

A61K 35/74
A61K 35/74

(21)Application number : 62-009925

(71)Applicant : ADVANCE CO LTD

(22)Date of filing : 21.01.1987

(72)Inventor : OKAZAKI HIDE

(54) ANTIBACTERIAL AGENT FOR SKIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the titled antibacterium agent containing bacterium cell of a microorganism belonging to the genus Streptococcus, etc., and/or water-extracted product thereof as an active ingredient.

CONSTITUTION: A bacterium cell of microorganism belonging to the genus Streptococcus, Lactobacillus or Bifidobacterium (e.g. Streptococcus faecium, Streptococcus durans, Streptococcus avium, Streptococcus faecalis, Lactobacillus brevis, Lactobacillus salivarius, Bifidobacterium adolescentis, etc.) and/or water-extracted product thereof is included as an active ingredient to provide the aimed antibacterial agent for skin. The agent has strong antibacterial property to Propionibacterium acnes which is an acne-genic-originated bacterium. The agent includes various kinds of cosmetic such as bathing agent or cosmetic for bath, facial-cleansing agent, or suntan cream, hair fixing agent, and, composition for skin coating, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-179829

⑬ Int. Cl.

A 61 K 35/74

識別記号

ADZ
ADA

庁内整理番号

8615-4C

⑭ 公開 昭和63年(1988)7月23日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑮ 発明の名称 皮膚用抗菌剤

⑯ 特 願 昭62-9925

⑰ 出 願 昭62(1987)1月21日

⑱ 発 明 者 岡 崎 秀 神奈川県相模原市下九沢767

⑲ 出 願 人 株式会社 アドバンス 東京都中央区日本橋小舟町5番7号

明 細 書

1. 発明の名称

皮膚用抗菌剤

2. 特許請求の範囲

- (1) ストレプトコッカス属、ラクトバチルス属又はビフィドバクテリア属に属する微生物の菌体及び／又は水抽出物を有効成分として含有することを特徴とする皮膚用抗菌剤。
- (2) 前記微生物がストレプトコッカス・フェシウム、同デュランス、同エビウム、同フェカーリス、ラクトバチルス・プレビス、同サリガリウス、ビフィドバクテリア・アドレセンテス、同アレベ、同ロンガムであることを更に特徴とする特許請求の範囲第(1)項に記載の皮膚用抗菌剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は有効成分としてストレプトコッカス

属に属する微生物、ラクトバチルス属に属する微生物／又はビフィドバクテリア属に属する微生物の菌体及び／又は水抽出物を含有する皮膚用抗菌剤、特に抗痘瘡剤、皮膚疾患改善剤乃至皮膚保護剤に関する。

主たる痘瘡(にきび *acne*)の原因であるプロピオニバクテリア・アクネス(*Propionibacterium acnes*又は*Corynebacterium parvum*)に対する抗菌性物質としては、hexachloropheneなどがあるが、人体ならびに腸内細菌に対する影響等の副作用につき実質的に未解明であり、皮膚塗布による皮膚吸収及び経口による体内への侵入に対し、必ずしも安全であるとはなし難いものである。

上記に鑑み本発明者らは鋭意研究の結果、健康人腸内細菌由来の乳酸菌であるストレプトコッカス属、ラクトバチルス属、又はビフィドバクテリア属に属する微生物の菌体乃至その水抽出物が、プロピオニバクテリア・アクネスに対し強い抗菌活性を有すること、及びこれら乳

酸菌菌体乃至水抽出物は腸内細菌や皮膚に対する影響を含めて、経口投与或いは皮膚塗布実験の結果、実質的に全然無毒性であることを知見し、本発明に到達したものである。

以下、本発明に於いて使用され得る微生物の種類と菌学的性質、スクリーニング方法、菌体調製法、及び薬理作用等につき詳細に分説する。

微生物

ストレプトコッカス属、ラクトバチルス属又はビフィドバクテリウム属に属する微生物であり、就中、ストレプトコッカス・フェシウム (*Streptococcus faecium*)、同デュランス (*S. durans*)、同エビウム (*S. avium*)、同フェカリス (*S. faecalis*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、同サリヴァリウス (*L. salivarius*)、ビフィドバクテリウム・アドレセンテス (*Bifidobacterium adolescentis*)、同ブレベ (*B. breve*)、同ロングム (*B. longum*) 等を好適なものとして例示し得る。ここで本発

明に於いて特に有用な菌株を微工研受託番号と共に表示すれば下記の第1表の通りである。

第1表

菌株名	受託番号
<i>Streptococcus faecium</i>	AD1005 FERN P-8697
<i>Streptococcus avium</i>	AD2001 FERN P-8698
<i>Streptococcus durans</i>	AD3003 FERN P-8699
<i>Streptococcus faecalis</i>	AD9002 FERN P-8696
<i>Lactobacillus brevis</i>	AD0012 FERN P-8695
<i>Lactobacillus salivarius</i>	AD0013 FERN P-8694
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	AD0053 FERN P-8693
<i>Bifidobacterium breve</i>	AD0054 FERN P-8692
<i>Bifidobacterium longum</i>	AD0057 FERN P-8691

-3-

菌学的性質

本発明微生物のスクリーニング法、同定など菌学的性質につき要約して示せば次の通りである。

1. スクリーニング方法

Watanabe, T., et al., Studies on streptococci, I. Distribution of fecal streptococci in man. Microbiol. Immunol. 25, 257-269 (1981)に記載の方法に準ずる。すなわち、上記文献に記載の通り、健康人の糞便を下記の組成(第2表)の希釈液で希釈し、ストレプトコッカスはKHN agar [vander Weil-Korstanje, J. A. A., and K. C. Winkler: J. Med. Microbiol. 8, 491(1975): 第3表]、ラクトバチルスはLBS agar [BBL, 第4表]、ビフィドバクテリウムはMPN agar [Tanaka, R. et al., Appl. Environ. Microbiol. 40, 866-869(1980), 第5表]に塗抹、37℃、好氣的乃至嫌氣的条件下で48-72時間培養し、生成コロニーをカウント、無作為に

ひろい、コロニー形、カタラーゼ活性(陰性)、グラム染色陽性球菌及び桿菌を分離し、生理的、生化学的性状を検査して分類同定した。

-4-

第2表

希釈液の組成

KN ₃ PO ₄	4.5g
Na ₂ HPO ₄	6.0g
L-システイン塩酸塩	0.5g
ツイーン80	0.5g
寒天	1.0g
精製水	1000ml

第3表

KHNagar (Red-Kanamyacin-milk agar)の組成

トリプトース	15g
肉エキス	3g
アジ化ナトリウム	0.2g pH6.8
食塩	5g 121℃ 10分間
寒天	18g
精製水	800ml

-5-

-156-

-6-

スキムミルク	16g
B ニュートラルレッド	40mg 100℃ 1時間
精製水	200ml
C カナマイシン	24mg
A, B, Cを別滅菌後、合し、平板とする。	

第4表

LBSagarの組成(BBL)

トリプトース	10g
肉エキス	5g
KH ₂ PO ₄	6g
クエン酸三アンモニウム	2g
グルコース	20g
無水酢酸ナトリウム	15g
ツイーン80	1g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	575mg
MnSO ₄ ・2H ₂ O	120mg
FeSO ₄ ・7H ₂ O	34mg
寒天	15g
精製水	100ml pH5.5
121℃ 15分間 加熱滅菌	

-7-

3% L-システイン塩酸塩	1ml
ナリジクス酸	10mg
1.6% ブロムクレゾールパープル	0.1ml
寒天	2g
精製水	100ml pH6.8
100℃ 30分間 圧力なし加熱滅菌	

2. 分離乳酸菌の同定

本発明微生物の一般的菌学的性質は同一分類につき、公知各文献の示すものと同一の諸性質を有する。

すなわち、ストレプトコッカス属細菌の選択培地KH₂Nagar培地、ラクトバチルス属細菌の選択培地LBSagar培地、そしてビフィドバクテリウム属細菌の選択培地MPNagar培地上のコロニー形状、グラム染色性、形態、生理生化学的性状により下記文献1)~4)を参照して同定した。

参考文献

- 1) 光岡知足：日本細菌学雑誌、24(6)、261-280(1969)

第5表

MPNagarの組成

ラクトース	2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
K ₂ HPO ₄	0.1g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	20mg
FeSO ₄ ・7H ₂ O	1mg
MnSO ₄ ・2H ₂ O	0.8mg
食塩	1mg
0.1% リサズリン	0.1mg
ビオチン	0.01mg
パントテン酸カルシウム	0.2mg
リボフラビン	0.1mg
アデニン	0.1mg
グアニン	0.1mg
キサンチン	0.1mg
ウラシル	0.1mg
ツイーン80	0.1g
10% ビルビン酸	0.1ml
8% Na ₂ CO ₃	5ml

-8-

- 2) Poupard, J. A., Husain, I. and Norris, R. F., : Bacteriol. Rev., 37 136-165 (1973)
- 3) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. 490-676(1974)
- 4) 光岡知足：臨床と細菌、2(3)、55(197)-97(239), (1975)

ここで同定の根拠としたその主な菌学的性状を要約して示せば、第6乃至第8表の通りである。

(以下余白)

第6表

	S. faecium AD1005	S. avium AD2001	S. durus AD3003	S. faecalis AD9002
グラム染色(陽性+)	+	+	+	+
カタラーゼ(煮沸血凝存在下)	-	+	+	+
10℃での増殖	+	+	+	+
45℃での増殖	+	+	+	+
pH9.5での増殖	+	+	+	+
6.5%NaClでの増殖	+	+	+	+
40%胆汁における増殖	+	+	+	+
1/1000亜硝酸銀での増殖	-	+	+	+
0.1%ナトリウムアルミナクでの増殖	+	UD	+	+
炭水化物発酵	+	+	+	+
アラビノース	+	+	+	+
グリセリン	-	+	+	+
ラフィノース	-	+	+	+
ソルビット	-	+	+	+
キシロース	+	+	+	+
マンニツト	+	+	UD	+
エスクリン加水分解	+	+	+	+
アルギニン加水分解	+	+	+	+

注) +; 陽性, -; 陰性, UD; 不定

第7表

	L. brevis AD0012	L. salivarius AD0013
グラム染色	+	+
カタラーゼ	-	-
ガス産生	+	-
15℃での増殖	+	+
45℃での増殖	-	+
炭水化物発酵	+	+
アラビノース	+	+
キシロース	+	+
リボース	+	+
マンノース	-	+
セロビオース	-	+
ラフィノース	+	+
ソルビット	-	+
キシロース	-	+
マンニツト	-	+
サリシン	-	+
アミダグリン	-	+
ラムノース	-	+

注) +; 陽性, -; 陰性

第8表

	B. adolescentis AD0053	B. breve AD0054	B. longum AD0057
グラム染色	+	+	+
グルコースからのガス生成	-	-	-
炭水化物発酵	+	+	+
アラビノース	+	+	+
キシロース	+	+	+
マンノース	+	+	+
セロビオース	+	+	+
ラフィノース	+	+	+
ソルビット	+	+	+
マンニツト	+	+	+
ソルビット	+	+	+
サリシン	+	+	+
アミダグリン	+	+	+
イヌリン	+	+	+
トレハロース	+	+	+
リボース	+	+	+

注) +; 陽性, -; 陰性, ±; 疑陽性

3. 培養方法

これらの微生物の培養は前出各文献に示す通りの常法によるものであるが、例えばストレプトコッカス属の微生物とラクトバチルス属の微生物はロゴサ(Rogosa)液体培地(注1)、ビフィドバクテリウム属の微生物はCAN液体培地(注2)にて、ストレプトコッカス属及びラクトバチルス属は好氣的又は嫌氣的に、そしてビフィドバクテリウム属は嫌氣的に培養し、得られた培養液を遠心分離して、その菌体が採集される。

(注1) ロゴサ液体培地の組成

蒸留水 1ℓ中に	
トリブチケース	10.0g
酵母エキス	5.0g
トリプトース	3.0g
K ₂ HPO ₄	3.0g
KH ₂ PO ₄	3.0g
酢酸ナトリウム(*)	1.0g
クエン酸三アンモニウム	2.0g
フィーン80	1.0g

グルコース	20.0g
L-システイン塩酸塩	0.2g
塩類溶液(**)	5.0ml
(pH7.0, 121℃ 15分間 加熱滅菌)	

(*) 酢酸ナトリウムはストレプトコッカスの場合には不要

(**) 塩類溶液 蒸留水100ml中に

HgSO ₄ ・7H ₂ O	11.5g
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.68g
MnSO ₄ ・2H ₂ O	2.4g

(注2) GAM 液体培地組成

GAMブイヨン「日水製薬株式会社」コード05422

	59.0g(12分)
ペプトン	10.0g
ダイズペプトン	3.0g
プロテオースペプトン	10.0g
消化血清末	13.0g
酵母エキス	5.0g

-15-

るものであるが、その典型的調製方法の幾つかにつき例示すれば次の通りである。

1. 熱水抽出処理

採集された菌体を80～130℃(より好ましくは100～120℃)、数分～数時間滅菌を兼ねた加圧乃至非加圧熱水抽出処理に付し、遠心分離処理等により、不溶固形分を除去して目的活性成分である水溶性成分が得られる。尚、抽出溶媒としては通常の生理食塩水(0.9%NaCl水溶液等)のみならず、所定pH値に調整された各種緩衝液、各種塩類溶液、水/アルコール>1/2(重量比)の程度の水:アルコール(ノタノールとエタノール)混合溶媒等、各種水性溶媒、水のみも又同様に使用され得る。

更に採集菌体を前記滅菌熱水抽出処理に付した全体を、遠心分離等の固形分除去処理に更に付することなくそのまま凍結乾燥、減圧乾燥、噴霧乾燥粉末等としたものも又、本発明皮膚用抗菌剤として有用なものであることが付言される。

肉エキス	2.2g
肝臓エキス末	1.2g
グルコース	3.0g
KH ₂ PO ₄	2.5g
塩化ナトリウム	3.0g
溶性デンプン	5.0g
L-システイン塩酸塩	0.3g
チオグリコール酸ナトリウム	0.3g
(pH7.3±0.1, 115℃ 15分間 加熱滅菌)	

得られた菌体は生菌体又は加熱処理等による死菌体として、いずれもそのまま薬剤として利用することができるが、超音波処理等により破壊菌体として利用に供されてもよい。したがって、本発明に於ける「死菌体」とはこれら破壊菌体の全部又は一部分をも包含するものである。

皮膚用抗菌剤の調製

本発明皮膚用抗菌剤は前記各微生物の各種滅菌処理菌体又はその水抽出成分を有効成分とす

-16-

2. 滅菌処理

採集菌体を噴霧乾燥等の加熱滅菌処理し、或いは超音波破壊処理(例えば、15kc, 60分)した各種滅菌処理菌体も又、本発明皮膚用抗菌剤の有効成分として使用され得る。更に、これら滅菌処理菌体を水抽出処理に付し、その水溶性成分とし、目的活性成分を得るようにしてよい。

1. 抗菌活性

1. 抗菌活性

後記実験例に示す通り、本発明皮膚用抗菌剤はプロピオニバクテリウム属中の痤瘡症の原因菌となる菌の増殖を極めて効果的に抑制乃至阻害する。他方、腸内細菌の主要乳酸菌(ストレプトコッカス・フェカリス、同フェシウム、ラクトバチルス・アシドフィルス、同サリゲリウス、同ブレビス、ビフィドバクテリウム・アドレセンテス、同ブレベ)には実質的に阻害効果を有しないという選択特異的抗菌スペクトルを示す。

-17-

-159-

-18-

2. 毒性

経口では実質的に全然無毒性であり、そのLD₅₀値は熱水抽出物乃至滅菌体として約5mg/マウス以上であった。

3. 使用態様

本発明皮膚用抗菌剤は沐浴剤乃至浴用化粧剤、洗顔料、日焼け止めクリーム、整髪・頭皮料、口紅・頬紅等々の各種化粧品、皮膚塗布用組成物として、或いは皮膚消毒剤に添加されて皮膚疾患改善乃至皮膚保護性塗布粉末或いはクリーム状の形態で好適に使用され得るものであるが、その使用量は処理菌体乃至水抽出物として通常0.001~10重量%(乾燥重量換算)程度である。

以下、実験例により本発明をより詳細に説明する。

実験例1

プロピオニバクテリウム・アクネス(Propionibacterium acnes: 1640001, 阪大微生物株保存施設より分与)の増殖阻害作用

ロゴサ(Rogosa)液体培地或いはCAM液体培地に、生菌数濃度およそ 10^6 /mlとなるように、本発明各乳酸菌を接種し、好氣的或いは嫌氣的条件下で15~24時間37℃で培養した。培養後、遠心分離により集菌し、集菌菌体を約10容の生理食塩水に懸濁し、再び集菌する事を2回繰り返し、洗浄菌体を集めた。これを1容の蒸留水中に懸濁し、110~120℃で10~15分間オートクレーブで加熱した。次いで遠心分離を行い、その上清そのまま或いはその凍結乾燥を試料とした。上記、試料を含有するCAM agar培地(注)を嫌気状態にして、嫌気下にプロピオニバクテリウム・アクネスを約 10^2 接種し培養した。48時間後の生成したコロニー数をカウントし、試料を含まないコントロールと比較して抑制率を測定した。その結果を第9表に示した。

(以下余白)

-19-

-20-

以上の結果より明らかなように、S.フェシウム、S.デュランス、B.アドレセンテスの3種はP.アクネスの増殖を強力に抑制し、他の6種も増殖を阻害した。

これら9種のうち、特にS.フェシウムAD1005は、コントロール(すなわち菌体抽出液のうちの溶媒である水のみ添加群である)にプレート当たり441個のP.アクネスコロニーを生ずるのに対し、プレート当たり1個とほぼ100%、P.アクネスの増殖を抑える程の制菌能をも示した。

実験例2

P.アクネス増殖過程に及ぼすストレプトコッカス属の抑制作用比較

実験例1と同様に調製した試料を含有するCAM液体培地を嫌気状態にして、嫌気下にP.アクネスを 10^6 /ml接種し培養した。そして、0、6、12、24、30時間後の生菌数(/ml)を測定した。その結果は第1図に示した。S.フェシウム、S.デュランス、S.エビウム、S.フェカ

第9表

菌名	菌数/プレート	抑制率
Control	441	99.8%
Streptococcus faecium AD 1005	1	90.9%
Streptococcus faecium AD 1006	40	59.6%
Streptococcus axium AD 2001	176	67.3%
Streptococcus durans AD 3003	56	33.6%
Streptococcus faecalis AD 9002	293	59.0%
Lactobacillus brevis AD 0012	151	75.5%
Lactobacillus salivarius AD 0013	108	83.7%
Bifidobacterium adolescentis AD 0053	72	44.7%
Bifidobacterium breve AD 0054	244	74.1%
Bifidobacterium longum AD 0057	114	

-21-

-160-

-22-

ーリスの順でP.アクネスの増殖を抑制した。
S.フェシウムAD1005においては30時間近くの
間、P.アクネスの増殖を抑制した。そして12
～15時間は0時の数より減少させ、制菌能をも
示した。

ここで省略したが、B.アドレセンテスAD0053
にも、S.デュランスとはほぼ同様な結果を示す
ことをつけ加えておく。

実験例3

S.フェシウムAD1005によるプロピオニバクテ
リウム・アクネスの増殖阻害作用

S.フェシウムAD1005について、実験例1と
同様に調製した菌体水抽出液を乾燥菌体重量に
おいて3段階濃度別にしてCAM液体培地に含有
させ、実験例2と同様な方法で行った。その結
果を第2図に示した。

図に示す通り、濃度(蛋白量)に比例してP.
アクネスの増殖を抑制し、培養12時間位まで抑

制能が著明であった。

抗菌スペクトル

前記各熱水抽出物を添加した常法によりヒト
腸内細菌(各種乳酸菌及び大腸菌)への影響を試
験した結果を下記第10表に要約して示す。表か
ら、当該熱水抽出物は主要な腸内細菌に対して
不活性であると認められる。

(以下余白)

-23-

第10表

抽出液	菌株名	抽出液濃度(蛋白量)									
		0.5g	0.1g	0.05g	0.02g	0.01g	0.005g	0.002g	0.001g	0.0005g	0.0002g
抽出液	S.フェシウム AD1005	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	S.エビウム AD2001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	S.デュランス AD3003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	S.フェカリス AD9002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L.ヤリグアリウス AD0013	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B.アドレセンテス AD0053	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B.プレベ AD0054	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B.ロンガム AD0057	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L.7シドフィウス	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L.7アローノグム	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B.7ドレセンテス	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
大腸菌		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注) - : 阻害なし, + : 阻害あり

-25-

-24-

急性毒性

① ICR系マウス(雄6週令、平均体重33.0±
0.5g)を使用し、前記熱水処理抽出物の製法
に従って調製した熱水抽出物をマウス当り9
×10⁸、9×10⁷、9×10⁶個の3段階の出発
菌数(各群10匹)に相当量でその生理食塩水
0.5ml懸濁液を腹腔内投与し、14日間マウス
の生死を観察した。

Behrens-Kärber法に従って算出したLD₅₀値
(mg/マウス)を第11表に示す。尚、逐日経口
投与、皮膚塗布では、いずれの場合でも全然
無毒性であった。

第11表

菌株名	LD ₅₀ (mg/マウス)
S.フェシウム AD1005	7.4mg
S.エビウム AD2001	7.3mg
S.デュランス AD3003	8.8mg
S.フェカリス AD9002	7.0mg
L.プレビス AD0012	6.6mg
L.ヤリグアリウス AD0013	6.0mg
B.アドレセンテス AD0053	7.2mg
B.プレベ AD0054	6.5mg
B.ロンガム AD0057	5.1mg

-26-

② ICR系マウス(雄6週令、平均体重 $30.5 \pm 0.6g$)を使用し、前記加熱滅菌体調製例に従って得られた滅菌体をマウス当り 9×10^3 、 9×10^4 、 9×10^5 個の3段階の菌体相当(各群10匹)でその生理食塩水 $0.5ml$ 懸濁液を腹腔内投与し、14日間マウスの生死を観察した。

Behrens-Kärber法に従って算出した LD_{50} 値(菌体個数/マウス)は、いずれの菌にあってても 6×10^3 個/マウス以上(腹腔内投与)であり、且つ経口投与、皮膚塗布ではいずれの場合でも実質的に全然無毒性であった。

使用例

1. 洗顔クリーム

脂肪酸	36
オレイルアルコール	1.5
ラノリン誘導体(E.O.付加物)	1.0
グリセリン	18.0
水酸化カリウム	6.0

-27-

3. 液状塗布剤

乳酸エチル	10ml
グリセリン	5~10ml
本発明水抽出物	1~5g
エタノール	全量で100ml

4. 軟膏剤

レゾルシン	6g
酸化亜鉛	6g
次硝酸ピスマス	6g
杜松モクタル	2g
ミツロウ	10g
黄色ワセリン	27g
精製ラノリン	26g
グリセリン	13g
本発明水抽出物	4g

本発明水抽出物	0.1~1.0
香料	0.5
防腐剤	適量
精製水	36~38.9
	100重量%

2. 沐浴剤

ラウリル硫酸トリエタノールアミン	40
ラウリル硫酸ナトリウム	5
ラウロイルサルコシン酸ナトリウム	3
ラウリルイミダゾリンジカルボン酸ナトリウム	10
ラウリル酸ジエタノールアミド	5
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム	0.3
ヘキサノタリン酸ナトリウム	1
プロピレングリコール	10
本発明水抽出物	1~5
香料、色素、防腐剤	適量
精製水	31~35
	100重量%

-28-

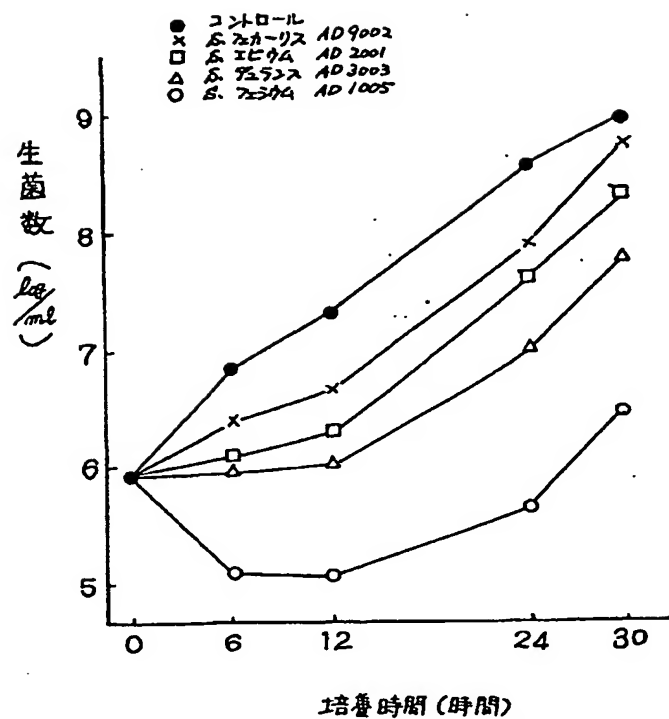
4. 図面の簡単な説明

第1図は、P.アクネス増殖過程に及ぼすストレプトコッカス属の抑制作用を比較したもので、横軸は培養時間、縦軸はP.アクネスの生菌数(\log/ml)を示す。

第2図は、S.フェシウムAD1005によるP.アクネスの増殖阻害作用を調べたもので、横軸は培養時間、縦軸はP.アクネスの生菌数(\log/ml)を示す。

特許出願人 株式会社アドバンス

第 1 図



第 2 図

